

COMPLEXOS IMUNES CIRCULANTES NA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL. IDENTIFICAÇÃO DE ANTÍGENOS PARASITÁRIOS NOS COMPLEXOS (*)

Júnia CHAVES (1), Rubens Guimarães FERRI (2), Teresa A. E. KLIEMANN (3), Ione
IRULEGUI (4) e H. B. W. T. de SOUZA (1)

R E S U M O

Complexos imunes circulantes (IC), formados com participação de antígenos liberados pelo *Trypanosoma cruzi*, foram observados em camundongos infectados com a cepa FL. A presença dos IC foi revelada por imunodifusão de soros de 10.º e 15.º dia da infecção, contra C_{1q} humano, após prévia concentração com polietilenoglicol (PEG) e solubilização em tampão borato. A presença de IC foi confirmada por redução e alquilação do mesmo material, seguida de nova difusão contra C_{1q}. Os antígenos parasitários presentes no IC foram identificados por difusão dos mesmos soros, após prévia concentração com PEG e dissociação em tampão glicina, contra soro hiperimune anti-*T. cruzi*. Os testes feitos indicam que as substâncias que reagem com C_{1q}, presentes nos soros dos animais infectados, são IC.

I N T R O D U Ç Ã O

Sabe-se, pelos trabalhos de SIQUEIRA & col. 15, DZEBENSKY 8, ARAÚJO 3 e ARAÚJO & col. 4, que o *Trypanosoma cruzi* libera "in vivo" antígenos solúveis. Entretanto, a possibilidade de que esses antígenos, juntamente com os anticorpos específicos, pudessem formar complexos imunes circulantes (IC) capazes de ativar o sistema complemento, e de características convenientes à posterior deposição nos tecidos, não tem sido suficientemente pesquisada na doença de Chagas.

Recentemente, SIQUEIRA & FERRIOLI FILHO 16 sugeriram a existência de correlação entre a queda dos níveis de complemento hemolítico total e os níveis máximos de antígenos circulantes, em ratos infectados por *T. cruzi*.

Neste trabalho, procuramos identificar a presença de IC formados com participação de antígenos parasitários que pudessem, pelo menos em parte, explicar a depleção do comple-

mento, referida pelos Autores anteriormente mencionados.

Para tanto, utilizamos a propriedade que certos IC possuem, de formar precipitados, em gel difusão, quando em reação com o componente C_{1q} do complemento; tal reação é abolida quando os IC são reduzidos e alquilados 1.

MATERIAL E MÉTODOS

T. cruzi — Foi utilizada a cepa FL, isolada e estudada por BRENER 6, cujas tripomastogotas sanguíneas se apresentam, após alguns dias de infecção, predominantemente como "formas largas".

Soros de camundongos em fase aguda da infecção — 45 camundongos SW, de 20-25 g de peso foram infectados por via intraperitoneal com 10⁵ tripomastogotas da cepa FL. Soros foram colhidos após 5, 10 e 15 dias. De cada san-

(*) Realizado com auxílio do CNPq-FINEP

- (1) Departamento de Medicina Tropical e Dermatologia — Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo
- (2) Centro de Pesquisas Imunoquímicas (C.P.I.) — Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo
- (3) Instituto de Saúde — Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo
- (4) Departamento de Medicina Preventiva, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, Brasil

gria foi feita mistura dos soros de 15 camundongos, a qual foi filtrada em "Milipore" (0,2 μ m), congelada rapidamente em nitrogênio líquido para evitar agregação de componentes séricos, e conservada a -70°C. Entre a sangria dos animais e a separação dos soros, feita a 4°C, não transcorreram mais de 40 minutos. Procedimento igual foi adotado para o mesmo número de animais-controle.

Concentração dos IC — Foi feita por precipitação dos soros com polietilenoglicol (PEG) 6.000 (Sigma) segundo técnica de ZUBLER & col.¹⁸ Após tratamento com PEG na concentração final de 4% os precipitados foram divididos em 2 alíquotas, sendo uma dissolvida em tampão borato¹⁸ pH 8,3 e a outra, dissociada em tampão glicina-HCl pH 2,8, conforme recomendação de BOUT & col.⁵ Depois de 5 horas a 4°C e centrifugação, os sobrenadantes foram conservados a -70°C ou utilizados imediatamente.

Os soros dos animais-controle receberam tratamento igual.

Imunodifusão em gel de ágar — Feita conforme a clássica técnica de OUCHTERLONY¹³. Como fonte de anticorpos para os antígenos circulantes do *T. cruzi*, foi usado soro hiperimune preparado em cavalo, por inoculações sucessivas de formas vivas de cultura, da cepa Y do *T. cruzi*. Posteriormente o anti-soro foi submetido à digestão enzimática pela pepsina, segundo FOPE¹⁴ e, antes do seu uso, absorvido com mistura de soros de camundongos normais com o fim de evitar reações inespecíficas. Outros 4 soros hiperimunes testados não reagiram.

Preparação de C_{1q} humano — Foi seguida técnica recomendada por WINCHESTER & AGNELLO¹⁷. Usou-se DNA tipo I, DNase tipo ST (Sigma), e as quantidades de C_{1q} parcialmente purificado obtidas, variaram de 1,7 a 4mg/ml. A identificação e atividade das preparações foram verificadas por difusão em gel de agarose contra anti-C_{1q} humano (Bioware) e aglutinação de partículas de látex, recobertas por Fração II^{9,10}.

Controles para a atividade precipitante do C_{1q} foram preparados com IgG humana (Behringwerke) e imunoglobulinas (Ig) de camundongos normais, obtidas estas últimas por precipitação com sulfato de amônio a 45% de saturação.

Para controles positivos, tanto a IgG humana como a de camundongo foram agregadas, de acordo com o método de MÜLLER-EBER-

HARD & KUNKEL¹¹. Primeiramente foram aquecidas a 63°C durante 12 minutos e posteriormente os agregados foram precipitados com sulfato de sódio. A concentração usada, de ambas, foi de 1mg de proteína por ml.

Também como controle positivo das preparações de C_{1q} foi utilizado complexo imune solúvel; IgG humana (Hyland) — anti-IgG humana (obtido no C.P.I.), preparado "in vitro", em zona de excesso de antígeno.

Como controles negativos foram usadas IgG humana e Ig de camundongo, sob forma monomérica, na concentração protéica de 1mg/ml, bem como soros de camundongos normais, tratados com PEG.

Imunodifusão em gel de agarose — Para verificação da presença de IC nos sobrenadantes dos precipitados obtidos com PEG a 4% e solubilizados, foi feita a difusão dos mesmos contra o primeiro componente do complemento humano C_{1q}. Tais reações, reconhecidas atualmente como de grande especificidade na detecção de IC, foram feitas de acordo com WINCHESTER & AGNELLO¹⁷, porém, a força iônica do tampão do gel de agarose foi de 0,11, uma vez que, redução da força iônica pode propiciar reações positivas com soros normais ou mesmo IgG monomérica².

Antes da pesquisa de IC nos precipitados obtidos dos soros de camundongos infectados, os controles para o C_{1q} foram aferidos: formaram-se linhas de precipitação evidentes, entre C_{1q} e IgG humana e Ig de camundongo agregadas, e complexo imune solúvel preparado "in vitro". IgG humana e Ig de camundongo, monoméricas, e soros normais, não reagiram.

Redução e alquilação dos IC — Os IC precipitados pelo PEG, suspensos em tampão borato foram submetidos, segundo recomendação de AGNELLO & col.¹, a processo de redução, feito com 2 mercaptoetanol (Sigma), durante 24 horas, na concentração final de 0,1M, seguido de alquilação em diálise contra 2-iodoacetamida (Sigma) 0,1M. Esta redução foi feita com a finalidade de diferenciar as reações de precipitações dos IC, daquelas devidas a "endotoxinas".

O complexo imune preparado "in vitro", a IgG humana e a Ig de camundongo agregadas, receberam o mesmo tratamento.

Todas as preparações foram submetidas a novas reações contra o C_{1q}, após o tratamento com 2-mercaptoetanol e 2-iodoacetamida. Veri-

ficou-se que a redução e alquilação do complexo imune solúvel, preparado "in vitro", eliminou a reação com o C_{1q}, o mesmo ocorrendo com a IgG agregada, tanto humana como de camundongo. No caso dos agregados foi, por vezes, necessário elevar para 0,2M a concentração de 2-mercaptoetanol.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os precipitados solubilizados, obtidos dos soros colhidos no 5.^o dia de infecção, não revelaram linhas de precipitação quando difundidos

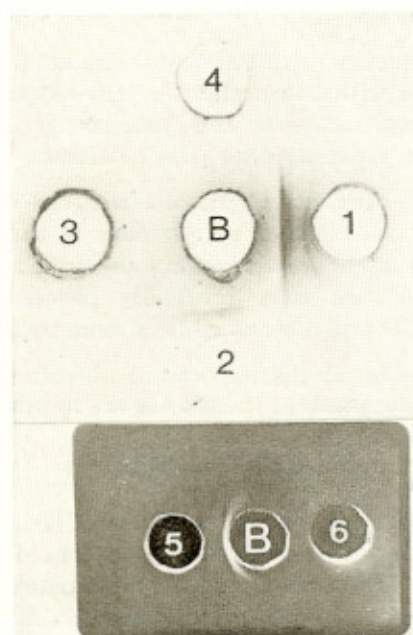


Fig. 1 — Difusão dos IC contra anti-*T. cruzi*

B — Soro de cavalo hiperimune anti-*T. cruzi*, absorvido com mistura de soros normais de camundongos.

1. Precipitado da mistura de soros de camundongos infectados, após 15 dias, obtido com PEG na concentração final de 4% e dissociado em tampão glicina-HCl, pH 2,8.
2. Idem, após 10 dias de infecção.
3. Idem, após 5 dias de infecção.
4. Mistura de soros de camundongos normais submetidos ao mesmo tratamento descrito em 1.
5. Igual a 1 (IC dissociado).
6. Precipitado da mistura de soros de camundongos infectados, após 15 dias, obtido com PEG a 4% de concentração final e dissolvido em tampão borato, pH 8,3.

dos contra o soro hiperimune anti-*T. cruzi*, o mesmo ocorrendo na difusão contra o C_{1q} humano. Parece-nos possível que aos cinco dias de infecção, os antígenos talvez liberados, ainda não se encontrem sob a forma de IC de tamanho molecular adequado.

Contrariamente, os precipitados dos soros colhidos no 10.^o e 15.^o dias, após dissociação em tampão glicina pH 2,8, revelaram linhas de precipitação contra o soro hiperimune anti-*T. cruzi* (Fig. 1). Os mesmos precipitados, quando apenas dissolvidos em borato, não revelaram tais linhas, indicando que os determinantes antigênicos dos antígenos de *T. cruzi* presentes no IC, encontravam-se ocupados pelos respectivos anticorpos.

Reações positivas, obtidas por imunodifusão contra C_{1q} humano, sugeriram fortemente a presença de IC nos precipitados obtidos dos soros colhidos no 10.^o e 15.^o dias. Os IC concentrados com PEG reagiram com C_{1q}, quando apenas dissolvidos em tampão borato; quando tratados com tampão glicina, não reagiram, indicando a dissociação dos IC (Fig. 2).

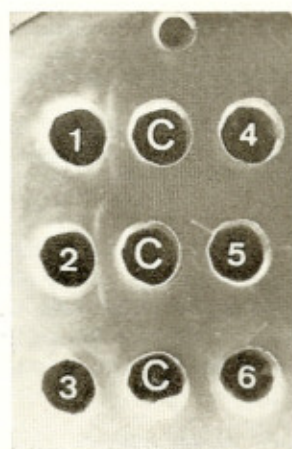


Fig. 2 — Difusão em gel de agarose, dos IC dissolvidos ou dissociados, contra C_{1q} humano.

C — C_{1q} humano parcialmente purificado (4mg/ml).

1. Precipitado da mistura de soros de camundongos infectados, após 15 dias, obtido com PEG a 4% de concentração final e dissolvidos em tampão borato, pH 8,3.
2. Idem, após 10 dias de infecção.
3. Idem, após 5 dias de infecção.
- 4, 5 e 6. mesmos precipitados de 1, 2 e 3 respectivamente, porém dissociados em tampão glicina-HCl, pH 2,8.

Após a redução a alquilação dos IC presentes nos soros dos camundongos infectados, obtidos no 10.^o e 15.^o dias, a reação contra C₁q foi negativa (Fig. 3).

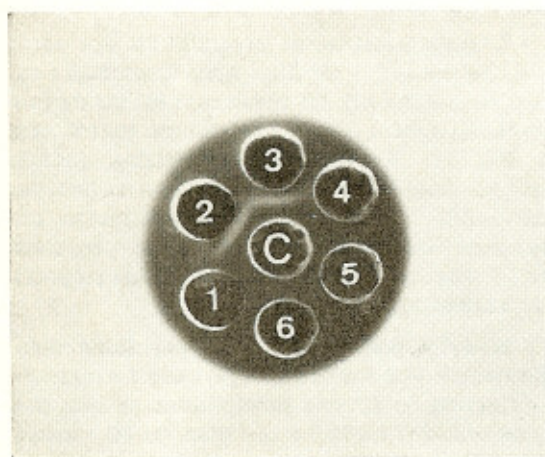


Fig. 3 — Difusão em gel de agarose, dos IC reduzidos e alquilados, contra C₁q humano.

C — C₁q parcialmente purificado (4mg/ml).

1. Ig de camundongo monomérica.
2. Ig de camundongo agregada (1mg/ml).
3. IC dos soros de camundongos infectados, após 15 dias.
4. Idem, dissociado em glicina.
5. Idem, após redução e alquilação.
6. IgG humana monomérica.

Através desta redução confirmou-se a presença de IC nesses precipitados e eliminou-se a possibilidade de eventuais reações, devidas apenas a antígenos talvez ainda livres, liberados na circulação pelo parasita, os quais pudessem reagir com o C₁q.

A presença de IC solúveis, formados com participação de antígenos parasitários e apresentando capacidade fixadora de complemento, parece-nos ser um dado novo na infecção experimental pelo *T. cruzi*. Estudos sobre a importância desses IC na patogenia da doença estão sendo feitos, já que lesões sugestivas de mecanismos patogênicos envolvendo a deposição de IC, como arterites necrotizantes, foram referidas há vários anos, em pacientes na fase crônica da doença, por BRITO & VASCONCELOS⁷ e em animais de laboratório por OKUMURA & col.¹²

SUMMARY

Circulating immune complexes in experimental Chagas'disease. Identification of parasite antigens in the complexes

Circulating immune complexes (IC) formed with participation of antigens liberated by *Trypanosoma cruzi* FL strain, were demonstrated in experimentally infected mice. The presence of IC was revealed in the sera collected at the 10th and 15th days of infection using human C₁q gel diffusion reactions. Sera were previously concentrated with polyethylene glycol (PEG) and dissolved in borate buffer.

Reduction with 2-mercapto-ethanol and alkylation with 2-iodoacetamide followed by C₁q reactions confirmed the presence of IC in the sera, since no lines were obtained.

The detection of parasite antigens in the IC was investigated by diffusion of the sera against anti-*T. cruzi* hyperimmune horse serum. Infected sera were previously concentrated with PEG and dissociated in glycine buffer.

Studies on the importance of such IC in the pathogenesis of the disease are in progress.

AGRADECIMENTOS

Os Autores são gratos ao Dr. Hélio Ferreira, da Sintex do Brasil S.A. pelo fornecimento do soro anti-*T. cruzi* purificado enzimaticamente e ao Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da U.S.P. pelo fornecimento do sangue humano para o preparo de C₁q.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. AGNELLO, V.; GABRIEL, A. & MINDY TAJ, B. A. — Detection of immune complexes. *J. Invest. Dermatol.* 67: 339-345, 1976.
2. AGNELLO, V.; WINCHESTER, R. J. & KUNKEL, H. G. — Precipitin reaction of the C₁q component of complement with aggregated γ -globulin and immune complexes in gel diffusion. *Immunology* 19: 909-919, 1970.
3. ARAÚJO, F. G. — Immunology of Chagas' disease. I — Circulating antigens in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 18: 433-439, 1976.

CHAVES, J.; FERRI, R. G.; KLIEMANN, T. A. E.; IRULEGUI, I. & SOUZA, H. B. W. T. de — Complexos imunes circulantes na doença de Chagas experimental. Identificação de antígenos parasitários nos complexos. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 21:77-81, 1979.

4. ARAÚJO, F. G.; NASCIMENTO, E. & MORATO, M. J. F. — Studies on the circulating antigens of *Trypanosoma cruzi* — Resumos IV. Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas, pg. 69, Caxambú, MG, Brasil, 1977.
5. BOUT, D.; SANTORO, F.; CARLIER, Y. & CAPRON, A. — Imunocomplexos na Esquistossomose. III. — Caracterização das imunoglobulinas e dos antígenos implicados no IC. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 19: 35-38, 1977.
6. BRENER, Z. — Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. & Parasitol.* 59: 19-26, 1965.
7. BRITO, T. & VASCONCELOS, E. — Necrotizing arteritis in megaesophagus. Histopathology of ninety-one biopsies taken from the cardia. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 1: 195-206, 1959.
8. DZEBENSKI, T. H. — Exantigen of *Trypanosoma cruzi* «in vivo». *Tropenmed. Parasitol.* 25: 485-491, 1974.
9. EWALD, R. W. & SCHUBART, A. — Agglutinating activity of the complement component C_q in the F-II latex fixation test. *J. Immunology* 27: 100-105, 1966.
10. JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; FERRI, R. G.; CHAVES, J. & KLIEMANN, T. A. E. — Staining of C_q protein from human and horse complement with dye Sirius Red (em publicação).
11. MÜLLER-EBERHARD, H. J. & KUNKEL, H. G. — Isolation of a thermolabile serum protein which precipitates γ -globulin aggregates and participates in immune hemolysis. *Proc. Soc. Biol. Med.* 106: 291-295, 1961.
12. OKUMURA, M.; BRITO, T. DE; PEREIRA DA SILVA, L. H.; CARVALHO DA SILVA, A. & CORREA NETO, A. — The pathology of experimental Chagas' disease in mice. I. Digestive tract changes. with a reference to necrotizing arteritis. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 12: 17-28, 1969.
13. OUCHTERLONY, O. — Antigen-antibody reactions in gels. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 26: 507-515, 1949.
14. POPE, C. G. — The action of proteolytic enzymes on the antitoxins and proteins in immune sera. III. Heat denaturation after partial enzyme action. *Brit. J. Exp. Path.* 20: 201-202, 1939.
15. SIQUEIRA, A. F.; FERRIOLI FILHO & CARVALHEIRO, J. R. — Um antígeno solúvel presente no soro de ratos infectados com *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 8: 148, 1966.
16. SIQUEIRA, A. F. & FERRIOLI FILHO — Aspectos imunológicos precoces observados em ratos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*. Resumos IV Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas, pág. 76, Caxambú, MG, Brasil, 1977.
17. WINCHESTER, R. J. & AGNELLO, V. — Detection of immune complexes by direct precipitation with C_q or IgM rheumatoid factors. *Ann. Rheum. Dis.* 36 (Suppl.): 35-36, 1977.
18. ZUBLER, R. H.; PERRIN, L. H.; GREIGHTON, W. D. & LAMBERT, P. H. — Use of polyethylene glycol (PEG) to concentrate immune complexes from serum or plasma samples. *Ann. Rheum. Dis.* 36 (Suppl.): 23-25, 1977.

Recebido para publicação em 17/10/1978.